

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99348

REQUERENTE: LABORATORI BALDACCI SPA, italiana, com sede
em Via San Michele degli Scalzi, 73, 56100
PISA, Itália

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de conjugados de cor-
ticosteróides com albumina humana e de composi-
ções farmacêuticas que os contêm"

INVENTORES: Fiume Luigi, Chiricolo Mariella, Busi Corra-
do, Mattioli Alessandro, Spinelli Cosima,
Spinosa Giulia, Bartolini Giovanna, Minghet-
ti Luisa, Orlandi Marina e Tomasi Vittorio

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Itália em 25 de Outubro de 1990 sob o nº 21880 A/90.



PATENTE Nº

"Processo de preparação de conjugados de corticosteróides com albumina humana e de composições farmacêuticas que os contêm"

para que
LABORATORI BALDACCI SPA, pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de conjugados de corticosteróides, nomeadamente a prednisolona ou betametasona, com albumina humana, o qual compreende conjugar o corticosteróide, previamente convertido no hemi-succinato, com albumina humana pelo método do anidrido misto, usando clorocarbonato de isobutilo, com uma razão molar entre corticosteróide e albumina humana entre 15 e 19.

O invento refere-se ainda ao processo de preparação de composições farmacêuticas contendo os referidos conjugados.

MEMÓRIA DESCRITIVA

O presente invento refere-se ao processo de preparação de novos derivados de corticosteróides, particularmente daqueles conhecidos sob os nomes de prednisolona e betametasona e de composições terapêuticas que os contêm, como ingrediente activo.

Como é sabido, os corticosteróides inibem a produção ou a libertação de mediadores produzidos pelos macrófagos, aos quais é atribuído um papel chave nos mecanismos da inflamação e na resposta imunitária (prostaglandinas, leucotrienos, etc.), (Schleimer R.P., ANN. Rev. Pharmacol. Toxicol., 25, 381 (1985)).

Uma vez que os esteróides são activos também sobre outros sistemas celulares envolvidos nos processos flogístico e imunitário é difícil avaliar em que medida a actividade destas drogas sobre os macrófagos se adiciona aos seus efeitos anti-inflamatório e imuno-supressivo. Sabe-se também, que a albumina, conjugada com pequenas moléculas é selectivamente absorvida das células do sistema macrófago (Kruse H., Mc Master P.D., J. Exp. Med. 90, 425, (1949)).

Por outro lado, experiências in vitro e in vivo têm mostrado que algumas toxinas, tais como a amanitina e a faloidina, e algumas drogas antivirais, tais como a arabinósido-citosina e a fluorodesoxi-uridina, após conjugação com a albumina não perdem a actividade biológica aplicada selectivamente nos macrófagos. (Derenzini M. e Coll., Lab. Invest., 29 150, (1973); Barbanti-Brodano G., Fiume I., Nature New Biology 243, 281, (1973); Barbanti-Brodano G., Derenzini M. Fiume L., Nature, 248, 63, (1974); Balboni P.G. e Colab., Nature 264, 181 (1976)).

Verificou-se agora que alguns corticosteróides, particularmente a prednisolona e a betametasona, se conjugados com albumina humana, entram especificamente nos macrófagos, sugerindo assim que, para algumas patologias, os seus efeitos terapêuticos podem ser explorados sem os efeitos secundários característicos destas drogas, graças à selectividade da distribuição celular depois da



administração.

Por sua vez, o processo do presente invento para a preparação dos conjugados anteriormente citados compreende a realização da conjugação entre albumina humana (HSA) e o corticosteróide na forma de hemi-succinato, preparado de forma conhecida per se, de acordo com o processo do anidrido misto usando clorocarbonato de isobutilo como descrito por Erlanger B.F. et al., J. Biol. Chem., 228, 713, (1975), e determinando por via espectrofotométrica (Erlanger B.F. *ibidem*) no conjugado resultante a razão molar entre o corticosteróide e a HSA, tendo-se verificado que esta razão estava em todas as experiências entre 15 e 19. Esta razão permanece inalterada também ao fazer-se a liofilização do conjugado e mantendo-se à temperatura ambiente durante um ano. A solução de conjugado, após 24 horas a 37 °C, não apresenta qualquer libertação de corticosteróide livre, demonstrando assim a estabilidade da ligação entre o corticosteróide e a HSA; esta ligação é muito provavelmente uma ligação carboamido entre o grupo succínico do corticosteróide e os grupos amino da lisina da proteína.

Para os testes farmacológicos, as preparações de conjugado foram marcadas com ^{125}I de acordo com o método de Fraker e Speck (Fraker P.J., Speck Jr. J. C., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849, (1978)).

Os macrófagos foram obtidos a partir de monócitos humanos isolados de sangue periférico (Orlandi M. e colab. Prostaglandins Leukot. Med., 18, 205, (1985)) e colocados em cultura durante seis dias em RPMI 1640 (Flow) contendo 10% de soro humano do grupo AB.

Os fibrócitos da linha celular murina 3T3 foram cultivados em RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal. Para as experiências sobre a penetração dos conjugados, as células (macrófagos ou fibroblastos) ($4-6 \times 10^6$) foram incubados em RPMI 1640 (sem soro) na presença de 300 ng/ml de PRDN-(^{125}I)HSA (actividade específica: $2,4 \times 10^6$ cpm/ μg). As células foram recolhidas no momento 0 e após uma hora; após três lavagens com solução salina

tamponada de fosfatos (PBS), foram colocadas em solução com 2 ml de NaOH 6N e em seguida efectuou-se a medição da sua radioactividade e do seu teor em proteína.

As concentrações de conjugado foram calculadas com base nos valores da radioactividade intracelular que foram obtidos subtraindo os cpm calculados no momento 0 dos medidos uma hora mais tarde (tempo 1 h). A produção de prostaglandina E_2 (PGE_2) e de tromboxano A_2 (TXA_2) foi induzida nos macrófagos por adição de 10% de soro bovino fetal ao meio de cultura (Bartolini G. e colab., Biochim, Biophys, Acta, 876, 486, (1986)).

Após 24 horas de incubação, os valores de PGE_2 e de tromboxano B_2 (metabolito estável de TXA_2) foram avaliados no meio de cultura por RIA (Orlandi, ibidem).

O quadro 1 mostra as concentrações de PRDN-(^{125}I)HSA nos macrófagos e nos fibrócitos cultivados durante uma hora na presença do conjugado. De acordo com as fontes da literatura que afirmam que as moléculas de albumina quimicamente modificadas entram selectivamente nos macrófagos, verificou-se que a concentração do conjugado nestas células é muito mais elevada do que a dos fibrócitos.

Quadro 1

Concentração de PRDN-(^{125}I)HSA em macrófagos e fibroblastos cultivados.

Células	PRDN-(^{125}I)HSA (ng/ml proteína da célula)
Macrófagos	24,8+/-4,6 ^a
Fibroblastos	0,8+/-0,1

a: valor médio dos resultados (+/-erro padrão) dos 4 testes.

Na fig. 1 incluída mostra-se que o conjugado PRDN-HSA inibe a produção de prostaglandina E_2 e de tromboxano A_2 induzida nos

macrófagos cultivados in vitro por adição de soro bovino fetal fresco.

A inibição refere-se à síntese de prostaglandinas E_2 (*) e de tromboxano $A_2(O)$ nos macrófagos. Cada ponto representa o valor médio dos resultados de quatro experiências. Os erros padrão da percentagem de inibição nas diferentes experiências variaram entre $\pm 0,6$ a $\pm 5,9$, dependendo das diferentes concentrações de conjugação. Para uma concentração de conjugado de $0,6 \mu\text{g/ml}$ correspondendo a $0,05 \mu\text{g/ml}$ de PRDN (prednisolona) acoplada, obteve-se uma inibição de 50% da produção de ambos prostaglandina e tromboxano.

Sem impor limites indevidos ao presente invento parece plausível atribuir a actividade do conjugado a uma libertação intracelular da droga, do portador: esta hipótese é suportada pelo facto de, como se sabe, a albumina depois da penetração nos macrófagos entrar nos lisossomas e por isso os esteróides mostram a sua actividade depois de se terem ligado a um receptor citossólico. Parece assim provável que o conjugado PRDN-HSA tenha o comportamento de um agente lisossometrópico: a ligação que liga a droga à albumina é quebrada nos lisossomas e a droga livre aplica o seu efeito farmacológico depois de atravessar a membrana lisossómica.

Esta selectividade de penetração do conjugado nos macrófagos tem a consequência de a actividade dos esteróide ocorrer assim apenas àquele nível sem os efeitos secundários comuns catalisados pela entrada da droga noutros sistemas celulares.

Voltando agora ao conjugado de betametasona (BMT), ela é conjugada com HSA depois da sua conversão no seu hemi-succinato. Esta preparação é aqui adiante descrita uma vez que o hemi-succinato, ao contrário do da prednisolona (PRDN), não está disponível comercialmente.

Dissolveram-se BMT ($0,5 \text{ mmoles}$), anidrido succínico (4 mmoles) e 4-dimetilaminopiridina ($0,17 \text{ mmoles}$) em 6 ml de piridina

anidra e mantiveram-se à temperatura ambiente. Após 24 horas, a cromatografia em camada fina numa placa de sílica - gel (60F-254; Merck) com 2-propanol/hidróxido de amónio concentrado/água (60:30:10 v/v) mostrou que praticamente todo o BMT tinha sido convertido no seu hemi-succinato. Neste ponto, o pH da mistura reaccional foi reduzido para o valor 1 por meio de HCl para precipitar o hemi-succinato de BMT. Após 1 hora a 0-4 °C, a mistura foi centrifugada, sendo o sobrenadante rejeitado. O hemi-succinato de BMT foi dissolvido em 12 ml de água adicionando NaHCO₃ em pó e em seguida precipitado de novo, com HCl, recolhido e seco sob vácuo (0,45 mmoles).

O hemi-succinato de BMT foi conjugado com HSA usando os mesmos procedimentos usados para a preparação do conjugado com hemi-succinato de PRDN. A razão molar droga/HSA, determinada espectrofotometricamente, foi de 15, 15 e 18 em três preparações diferentes.

A acção do conjugado BMT-HSA foi testada sobre a produção de prostaglandinas E₂ induzida em macrófagos activados in vitro adicionando 10% de soro fetal. Usou-se o método usado para o conjugado PRDN-HSA. Os resultados, apresentados na fig. 2, mostraram que também o conjugado com BMT evita a formação de PGE₂. Foi conseguida uma inibição de 50% com concentrações de BMT-HSA de 0,3-0,4 µg/ml, correspondendo a 0,02-0,03 µg de BMT/ml.

Nas experiências efectuadas na ratazana, a penetração in vivo do conjugado BMT-HSA nas células do parênquima do fígado foi comparada com a penetração nas células sinusoidais do mesmo órgão as quais pertencem ao sistema das células macrófagas (Van Furth et al. Bull Wld Hlth Org. 46, 854 (1972)). Para estas experiências, usou-se uma preparação de conjugado radioactivo obtida por ligação de hemi-succinato de BMT a HSA marcado de acordo com o método de Jentof e Darborn usando formaldeído tritiado e seguindo o método descrito em Fiume et al. Cancer Drug Delivery 4, 11 (1987) (actividade específica $1,2 \times 10^6$ dpm/mg). A razão molar droga/proteína do conjugado radioactivo foi de 15. As experiências foram realizadas exactamente como descrito em Fiume et

al., Cancer Drug Delivery 4, 11 (1987).

Os resultados, apresentados no quadro 2, mostram que a concentração do conjugado nas células sinusoidais é cerca de cem vezes mais elevada do que nas células do parênquima.

Quadro 2

Distribuição do conjugado BMT-Albumina nas células do parênquima do fígado 30 minutos depois da sua administração.

Composto	dose ($\mu\text{g/g}$)	células	células
		do parênquima	sinusoidais
BMT- $[\text{}^3\text{H}]$ HSA	35	1,3+/-0,3	146,5+/-1,2

As experiências foram realizadas de acordo com o descrito em Cancer Drug Delivery 4, 11 (1987).

Os resultados foram calculados a partir dos valores de radioactividade insolúvel em ácido das preparações celulares. Eles foram expressos em percentagem de dpm injectado $\times 10^3$ de proteínas celulares. Os valores representam a média (+/-erro padrão) dos resultados de quatro experiências.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação de um conjugado de um corticosteróide e de albumina humana, caracterizado por se fazer reagir o corticosteróide, na forma de hemi-succinato, com albumina humana, pelo método do anidrido misto, usando clorocarbonato de isobutílo.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido corticosteróide ser seleccionado de entre prednisona e betametasona e por a razão molar entre corticosteróide e albumina humana estar entre 15 e 19.

3 - Processo de preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por se associar um conjugado de acordo com as reivindicações 1 e/ou 2, como ingrediente activo, com portadores ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

Lisboa, 25. III 1991

Por LABORATORI BALDACCİ SPA
=O AGENTE OFICIAL=





